

# EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM GENÓTIPOS DE CAFEEIROS COM RESISTÊNCIA AO FUNGO *CERCOSPORA Coffeicola* (Berk & Cooke)

MARIANA M. **SANTOS**<sup>1</sup>; JULIETA A.S. **ALMEIDA**<sup>2</sup>; OLIVEIRO G. **FILHO**<sup>3</sup>

Nº 10130

## RESUMO

A cercosporiose, causada pelo fungo *Cercospora coffeicola* (Berk & Cooke) é uma doença que limita a produtividade do cafeeiro. A multiplicação de genótipos resistentes a esse fungo via embriogênese somática (ES) é fundamental para estudo relacionado à interação cafeeiro-fungo. Em *Coffea*, a ES pode ocorrer pela via indireta (ESI) e ou direta (ESD). A ESI apresenta duas fases, primeiro a calogênese seguida da embriogênese enquanto a ESD ocorre numa única fase, onde os embriões formam-se diretamente na borda do explante. A aplicação da ESD reduz o uso de insumos e mão de obra, o que a torna mais vantajosa que ESI. Neste estudo, pretendeu-se avaliar a ESD em genótipos de *C. arabica*: Híbrido F1 H8105-7 (Catuaí Vermelho X BA10) EP131 C91 e como controle as cultivares Ouro Verde e Bourbon Amarelo respectivamente, susceptível e resistente à cercosporiose. Explantes foliares desses genótipos foram submetidos à aplicação da ESI e ESD. Aos 240, dias após o início do experimento, verificou-se que na ESD houve formação de embriões enquanto na ESI não ocorreu. Além disso, na ESD, a cv Ouro Verde apresentou maior produção que os outros genótipos.

---

1. Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, PUC-CAMPINAS, Campinas-SP, □  
[mariana\\_martinis@hotmail.com](mailto:mariana_martinis@hotmail.com)

2.Orientador: Pesquisadora, CENTRO DE CAFÉ “ALCIDES CARVALHO”/IAC, Campinas-SP

3. Colaborador: Pesquisador, CENTRO DE CAFÉ “ALCIDES CARVALHO”/IAC, Campinas-SP

## ABSTRACT

The cercosporiose, caused by the fungus *Cercospora coffeicola* (Berk & Cooke) is a disease that limits the productivity of the coffee grower. The multiplication of genotypes resistant of these funguses by somatic embryogenesis is fundamental for the studies about the relation coffee-fungus. In *Coffea*, the somatic embryogenesis can occur by the indirect form (ISE) or by the direct form (DSE). The ISE has two phases, first the callus and then the embryogenesis. The DSE occurs in one single stage, the embryos are formed directly in the edge of the explants. The application of DSE reduces the use of inputs and labor, that make it more worthwhile than ISE. In this study it was intended to evaluate the DSE in genotypes of *C. arabica* Híbrido F1 H8105-7 (Catuaí Vermelho X BA10) EP131 C91 and like control the cultivars Ouro Verde and Bourbon Amarelo respectively, susceptible and resistant to the cercosporiose. The leaf explants of these genotypes were subjected in application of ISE and DSE. By 240 days, after the beginning of the experiment, it was verified that on the DSE there was formation of embryos while on the ISE it wasn't. Moreover, on DSE the genotype Ouro Verde presented bigger production than the other genotypes.

## INTRODUÇÃO

A cercosporiose ou mancha-do-olho-pardo, causada pelo fungo *Cercospora coffeicola* (Berk & Cooke) é uma das principais doenças do cafeeiro, que limita a sua produtividade e qualidade. A multiplicação de genótipos resistentes a cercosporiose é fundamental para estudo relacionado à interação cafeeiro-fungo. A multiplicação desses genótipos pode ser obtida via embriogênese somática (ES) que permite gerar clones dos mesmos. Nesse processo, inicialmente ocorre a indução, células do explante adquirem a característica embriogênica, seguida da expressão do embrião somático (Fehér et al, 2003; Jiménez, 2005).

A ES pode ocorrer pela via indireta (ESI) e ou direta (ESD), sendo que genótipos de *Coffea* respondem com sucesso para as duas vias. A ESI apresenta duas fases, na primeira, células diferenciadas do explante passam por intensa divisão celular que leva à formação do calo (Berthouly & Michaux-Ferrière, 1996), na segunda ocorre a iniciação dos embriões somáticos a partir de algumas células do calo. Na ESD, os embriões iniciam-se diretamente de células da borda do explante as quais já estão determinadas e competentes para o desenvolvimento embriogênico (Dublin, 1981; Williams & Maheswaran. 1986).

A ocorrência da ESI em *Coffea* está associada ao balanço entre os reguladores de crescimento de planta auxina e citocinina, classicamente demonstrado por Sondhal & Sharp (1977) enquanto na ESD o controle se deve as citocininas, principalmente ao 2-iP (2-isopenteniladenina) e a zeatina (Ramos et al., 1993; Almeida et al., 2007). Mas, na literatura encontram-se alguns estudos com o uso da citocinina 6-BA (6-Benziladenina) para a indução da ESD em arabica (Yasuda et al., 1985; Almeida et al., 2006; Almeida & Silvarolla, 2009).

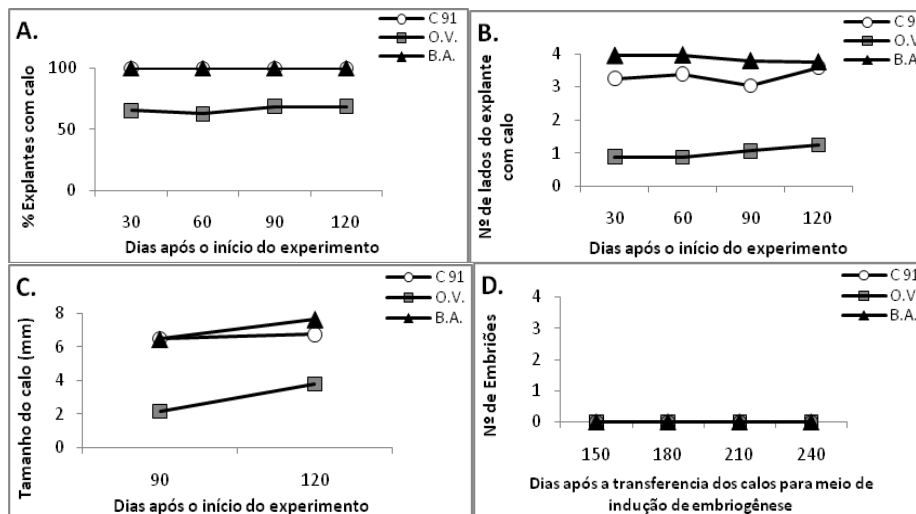
A ESI é a via mais aplicada para genótipos de *C. arabica* como ela também proporciona maior formação de embriões que a ESD (Vieira & Kobayashi, 2000). No entanto, a ESD é mais vantajosa que a ESI, pois ocorre numa única fase, o que resulta em redução da manipulação, do uso de insumos e do tempo da formação dos embriões (Altmann & Loberant, 1998; Kumar et al., 2006). Desta forma, este estudo objetivou caracterizar a capacidade de ESD de três genótipos de *Coffea arabica* Híbrido F1 H8105-7 (Catuai Vermelho X BA10) EP131 C91, e as cultivares Ouro Verde e Bourbon Amarelo, com resistência e susceptibilidade à cercosporiose, respectivamente.

## MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido no Centro de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Café 'Alcides Carvalho', do IAC. Foram utilizadas folhas coletadas até o terceiro par de ramos plagiotrópicos de plantas de *C. arabica*: Híbrido F1 H8105-7 (Catuai Vermelho X BA10) EP131 C91 e as cultivares Ouro Verde (OV) e Bourbon Amarelo (BA), que se encontram no Banco de Germoplasma do Café, do IAC. As folhas coletadas foram desinfestadas por duas vezes com solução de hipoclorito de sódio 2 % por 25 minutos. Explantes foram inoculados em frascos de vidro (200 mL) contendo 30 mL de meio de cultura, mantidos no escuro, a 25 °C até a formação de calos (ESI) e ou dos embriões (ESD). Aos 120 dias, os calos da ESI foram fragmentados e transferidos para meio de indução de embriogênese. Para a ESD foi utilizado meio de cultura com ½ da concentração dos sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescidos de sacarose (20 g/L) e 6-BA (30 µM) (Almeida & Silvarolla, 2009). Na ESI para a calogênese utilizaram-se sais de MS com adição de 30 g/L de sacarose e ácido 2,4 diclorofenoacético (2,4D) (2,5 µM) e cinetina (5,0 µM) e para embriogênese foi usado meio com ½ da concentração de sais de MS e 20 g/L de sacarose, ácido naftalenoacético (ANA) (0,5 µM) e cinetina (2,4 µM). Cada tratamento constou de 15 repetições e avaliado quanto à presença de calo, número de lados do explante com calo, tamanho do calo e número de embriões formados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A FIGURA 1A mostra a porcentagem de explantes com calo, nota-se que a cv OV produziu menos que os outros genótipos ao longo do experimento. Na FIGURA 1B, os genótipos BA e C91 apresentaram maior número de lados com formação de calo que o OV. O tamanho dos calos foi maior para os genótipos BA e C91 (FIGURA 1C). A FIGURA 1D mostra que não houve produção de embriões para nenhum dos genótipos na ESI até 120 dias de experimento.



**FIGURA 1.** ESI em explantes foliares de genótipos de *Coffea arabica*, sob ausência de luz e a 25 °C. **D.** Número de lados do explante retangular com formação de calo, notas: **1.** um lado ... **4.** quatro lados.

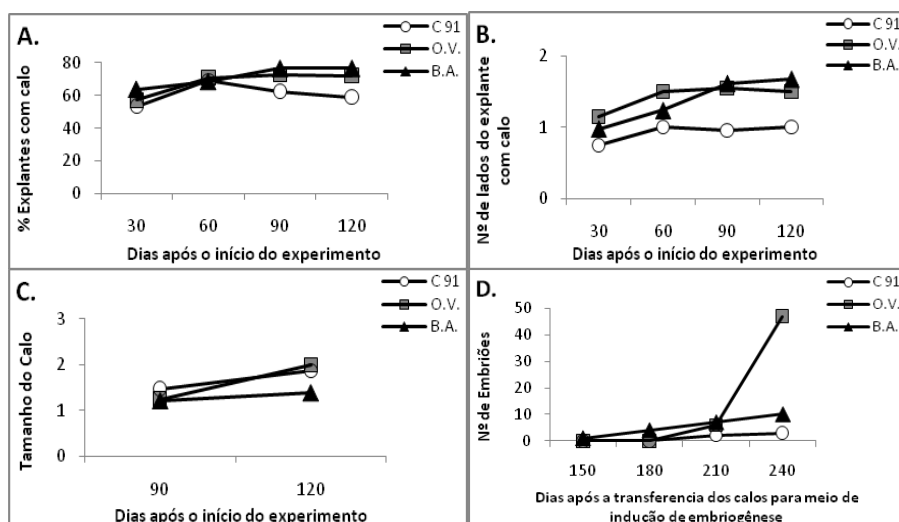
A FIGURA 2A mostra a porcentagem de explantes com estrutura embriogênica, cuja taxa de formação foi inferior a 80 %. Na FIGURA 2B nota-se que o número de lados com formação de estrutura embriogênica foi maior para os genótipos OV e BA e menor para C91. O tamanho das estruturas embriogênicas formadas foi semelhante entre os três genótipos. (FIGURA 3C). A FIGURA 3D mostra que houve formação de embriões nos explantes de todos os genótipos, porém o Ouro Verde apresentou maior número em relação aos outros.

## CONCLUSÃO

Dos resultados obtidos neste estudo foi possível constatar que os genótipos de *C. arabica* estudados possuem capacidade de responder a ESD. Embora, o número de embriões formados tenha sido baixo, possivelmente num próximo estudo estes genótipos poderão

atingir maior produção se forem submetidos a outros tratamentos como diferentes temperaturas e influência da época do ano em que as folhas são coletadas.

Na ESI todos os genótipos formaram calos, sendo que a C91 e o BA foram mais eficientes que o OV, mas nenhum deles produziu embriões. Por outro, na ESD todos os genótipos formaram embriões e dentre estes a OV atingiu maior número.



**FIGURA 2.** ESD em explantes foliares de genótipos de *C. arabica*, sob ausência de luz e a 25 °C. **D.** Número de lados do explante retangular com formação de estrutura embriogênica, notas: **1.** um lado... **4.** quatro lados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, J.A.S., Silvarolla, M.B., Braghini MT & Fazuoli, L.C. Somatic embryogenesis in genotypes of *Coffea arabica* with reduced caffeine content. In: 21th Colloquium of International Coffee Science Association, ASIC, Montpellier-France, 2006. **Proceeding of... Montpellier 2006**
- Almeida, J.A.S., Carmazini, V.C.B., Ramos, L.C.S. Indirect effect of agar concentration on the embryogenesis responses of *Coffea canephora*. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, v.1, p.121-125. 2007.
- Almeida, J.A.S. & Silvarolla, M.B. Induction of Somatic Embryos of *Coffea arabica* Genotypes by 6-Benzyladenine. **International Journal of Plant Developmental Biology**, v.3, p. 5-9. 2009.
- Altman, A. & Loberant, B. Micropropagation: clonal plant propagation *in vitro*. In: Altman A (Ed) **Agricultural Biotechnology**, Marker Dekker, New York, pp 19–42. 1998.

- Berthouly, M. & Michaux-Ferrière, N.M. High frequency somatic embryogenesis I *Coffea canephora*. Induction conditions and histological evolution. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 44, p. 169-176. 1996.
- Dublin, P. Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier arabusta. **Café Cacao Thé**, v. 25, n. 4, p. 237-241. 1981.
- Fehér, A., Pasternak, T.P. & Dudits, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, p. 201-228. 2003.
- Jiménez, V.M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v. 47, p. 91-110. 2005.
- Kumar, V., Naidu, M.M. & Ravishankar, G.A. Developments in coffee biotechnology *in vitro* plant propagation and crop improvement. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 87, n. 1, p. 49-65. 2006.
- Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497. 1962.
- Ramos, L.C.S., Yokoo, E.Y. & Gonçalves, W. Direct somatic embryogenesis is genotype specific in coffee. ASIC, 15 th Colloquium of International Coffee Science Association, ASIC, Montpellier-France, 1993. **Proceeding of...** Montpellier, pp. 763-766. 1993
- Santana-Buzzy, N., Herrera, R.R., Ávalos, R.M.G., Ku-Cauich, J.R., Mijangos-Cortés, J., Gutiérrez-Pacheco, L.C., Canto, A., Quiroz-Figueroa, F. & Loyola-Vargas, V.M. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. **In Vitro Cell Development Biology-Plant**, v. 43, p. 507-520. 2007
- Söndahl M.R. & Sharp, W.R. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. **Zeitschrift Pflanzenphysiologie**, v. 81, p. 395-408. 1977.
- Vieira, L.G.E. & Kobayashi, A.K. Micropropagação de cafeeiro. In: Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil, Poços de Caldas-MG, 2000, **Anais ...Poços de Caldas**, 2000.
- Yasuda, T., Fujii, Y. & Yamaguchi, T. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. **Plant Cell Physiology**, v.26, n. 3, p. 595-597. 1985.
- Williams., E.G. & Maheswaran, G. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. **Annals of Botany**, v. 57, p. 443-462. 1986.